



TITLE:

液体クロマトグラフィー質量分析
による醸造過程代謝物の網羅分析
法の開発と食品への応用(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

吉田, 寛郎

CITATION:

吉田, 寛郎. 液体クロマトグラフィー質量分析による醸造過程代謝物の網羅分析法の開発と食品への応用. 京都大学, 2015, 博士(人間・環境学)

ISSUE DATE:

2015-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12961>

RIGHT:

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	吉田寛郎
論文題目	液体クロマトグラフィー質量分析による醸造過程代謝物の網羅分析法の開発と食品への応用		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞の生命活動によって生じる内因性代謝物を網羅的に検出・解析して、生体内メカニズムや生物反応を研究しようとするメタボロミクスは、今や食品分析にも応用されるようになった。食品に含まれる代謝物を網羅分析し、その機能発現や起源解析の鍵となる成分を特定する研究が活発である。しかし、メタボロミクス研究に適した手法であると考えられる液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた研究は、数少ない。また、日本独自の食品を対象としたメタボロミクス研究による解析も、未だほとんど行われていない。本論文は、こうした研究状況を踏まえて、液体クロマトグラフィー質量分析法による内因性醸造過程代謝物の網羅分析法の基盤技術を開発し、日本の代表的発酵食品である醤油と味噌を対象としてメタボロミクス研究を行って、製造法の違いと熟成度を反映する代謝物を特定することを試みたものである。</p> <p>本論文は、全5章によって構成されている。</p> <p>第1章では、メタボロミクス研究における分析手法と食品メタボロミクス研究に関する概論を述べている。メタボロミクス研究に用いられるさまざまな分析手法を概観し、それらの長短について解説している。液体クロマトグラフィー質量分析法に焦点を当て、醸造過程代謝物の分析には液体クロマトグラフィーが適しているものの、その検出器に質量分析計を用いるにはさまざまな課題があることを指摘している。食品メタボロミクス研究に関する世界の研究動向と日本独自の食品を対象としたメタボロミクス研究についての現状について解説し、それらの問題点を指摘している。これらを踏まえたうえで、本論文での研究目的を、液体クロマトグラフィー質量分析法の導入による食品メタボロミクス研究の充実と革新、日本独自食品の特色と優位性の科学的解明に向けたメタボロミクス研究の適用と推進に定めている。</p> <p>第2章では、液体クロマトグラフィー質量分析法による分析基盤技術を整備するため、代謝物を分離する古典的な手法であるイオン交換クロマトグラフィーからの溶離液を、自動的に脱塩して質量分析計に導入する技術について検討した。電荷をもつ醸造過程代謝物を分離するにはイオン交換クロマトグラフィーは最適であるが、溶離液に用いられるリン酸やホウ酸の溶液は揮発性に乏しく質量分析計には直接導入しにくいからである。著者は揮発性のイオン対生成試薬を脱塩に用い、カラムスイッチング法とトラップカラムを組み合わせる方法により、効果的に脱塩が可能であることを見出した。本法により10種のアミノ酸を測定することが可能となった。電解質が高濃度に含まれる代謝物分離溶液の自動脱塩技術は、全くと言ってよいほど実用化されていない。本技術はそれを可能とした。</p> <p>第3章では、分離機能の異なるさまざまなカラムと溶離液の組み合わせを検討し、醸造過程代謝物をより多く網羅的に分析できる液体クロマトグラフィー質量分析システムを開発した。ペンタフルオロフェニルプロピルシリカカラムを分離カラムに、ギ酸水溶液とアセトニ</p>			

トリルのグラジエント混合溶液を溶離液に用いることにより、137種類のアミノ酸、有機酸、核酸関連物質を分離・定量できることが分かった。本法を用いて、日本独自の発酵食品の一つである醤油中の代謝物を測定した。測定結果を主成分分析により解析し、製造法の違いを反映する代謝物の特定に成功し、それらがグルタミン酸とアスパラギン酸であることを示した。この結果は、醤油の製造工程から考えても妥当であると言える。

第4章では、第3章で開発した液体クロマトグラフィー質量分析法による醸造過程代謝物の網羅分析法を駆使して、同章で分析した醤油とともに代表的な日本独自の発酵食品である味噌に関するメタボロミクス研究を行った。発酵期間の異なる味噌を分析して、醸造過程代謝物の網羅分析と熟成度を反映する物質の特定を試みた。その結果、本法によってアミノ酸、有機酸、核酸関連物質に加えて、メイラード反応の中間生成物であるアマドリ化合物も分離定量できることが分かった。また、本法は多数の代謝物を分離して網羅的に測定できる点において、従来のオクタデシルシリカカラム法に比べ格段に優れていた。加えて、発酵期間の違いによってアミノ酸、有機酸ならびにアマドリ化合物の濃度が変化すること、すなわちこれらの物質が味噌の熟成度を反映する物質であることを示した。

第5章では、本論文の第1章から第4章を総括している。特に、第3章で開発した液体クロマトグラフィー質量分析の手法が世界的に多くの研究者によって活用されていて、市販製品としても提供されていること、産学の両分野での食品メタボロミクス研究の進展に貢献していることを述べた。さらにその方法の普及に伴って、補酵素、糖リン酸、トリペプチドの分析も本法により可能となっていることを報告した。

(論文審査の結果の要旨)

食品分析にメタボロミクスを応用した研究が活発に行われている。メタボロミクスは、生物活動によって生み出された内因性代謝物を網羅的に検出・解析して、多数の情報をもとに生体内メカニズムや生物反応を研究するものである。本論文は、食品メタボロミクス研究、特に内因性による醸造過程代謝物を対象とした網羅分析に、液体クロマトグラフィー質量分析法が優れた能力を発揮するであろうことに着目し、その分析基盤技術を開発し、その方法を駆使して日本独自の発酵食品である醤油と味噌を対象とする食品メタボロミクス研究への応用を試みたものである。

第1章は緒言である。メタボロミクス研究に用いられる分析手法と食品メタボロミクス研究の最近の動向について概説し、本論文の研究目的である液体クロマトグラフィー質量分析法の導入による食品メタボロミクス研究の充実と革新、日本独自食品の特色と優位性の科学的解明に向けたメタボロミクス研究の適用と推進の重要性を述べている。まず、食品メタボロミクス研究に応用される液体クロマトグラフィー質量分析法やその他のさまざまな分析法について概観し、その長短を議論している。その結果、醸造過程代謝物の分離には液体クロマトグラフィーが適するが、分析物の同定を可能とする質量分析計を検出器として用いるためには、解決すべきいくつかの課題があることを指摘した。これは醸造過程代謝物の網羅分析に対する液体クロマトグラフィー質量分析法の長短を的確に捉えていて、著者が本論文での研究目標に到達するにあたってのよい指針を与えていると評価される。食品メタボロミクス研究に関する世界と日本の研究の現状を議論することで、それらの問題点を指摘するとともに、日本独自の食品に対する研究の必要性について食品化学の見地から説いている。新たな研究領域開拓への展望は斬新であり、高く評価される。

第2章では、古典的な手法ではあるが、電荷をもつ醸造過程代謝物の分離に適するイオン交換クロマトグラフィーを用いた液体クロマトグラフィー質量分析法について研究している。溶離液に大量に含まれる不揮発性のリン酸塩やホウ酸塩を自動的に除去し、その溶液を質量分析計に導入する方法を新たに開発した。カラムスイッチング法とトラップカラムを組み合わせ、ペンタデカフルオロオクタン酸を醸造過程代謝物とのイオン対生成試薬に用いることにより効果的に脱塩することが可能であることを見出した。この方法により10種のアミノ酸を測定することが可能となった。電解質が高濃度に含まれる代謝物分離溶液の効果的な脱塩技術に関する報告は数少ない。本法を今後、活用・発展させることによって、イオン交換クロマトグラフィーを用いた醸造過程代謝物の網羅分析、メタボロミクス研究が進むものと考えられる。この意味で本研究の重要性は高い。

第3章では、さまざまな分離カラムとその溶離液について醸造過程代謝物の網羅分析への適用性を検討し、最適と言える組み合わせを見出した。ペンタフルオロフェニルプロピルシリカカラムを分離カラムに、ギ酸水溶液とアセトニトリルのグラジエント混合溶液を溶離液に用いることで、137種類ものアミノ酸、有機酸、核酸関連物質を定量できることを明らかにした。このような多種類の醸造過程代謝物を定量できることは、メタボロミクス研究において強力な網羅分析法と言え、分析化学的にも高く評価される。

この方法を日本独自の発酵食品である醤油の分析に適用し、醸造過程代謝物の網羅分析

を行った。多種類の醤油の測定結果をもとに主成分分析を施して、製造法の違いを反映する代謝物をグルタミン酸およびアスパラギン酸と特定した。これは醤油の製造工程から考えても適正であり、日本独自の食品に対するメタボロミクス研究の先駆として価値あると言える。

第4章では、上述した液体クロマトグラフィー質量分析法による醸造過程代謝物の分析法を駆使して、醤油に加えてもう一つの日本独自の代表的発酵食品である味噌を対象にして、網羅分析を行った。発酵期間の異なるさまざまな味噌について醸造過程代謝物を分析して、熟成度を反映する物質の特定を試みた。その結果、137種のアミノ酸、有機酸、核酸関連物質に加えて、メイラード反応の中間生成物であるアマドリ化合物も分離定量できることが分かった。アマドリ化合物は還元糖とアミノ化合物が縮合してできる物質であり、食品の加熱・貯蔵・乾燥の過程で生成する。したがって、味噌の熟成に直接に関連する物質である。このような物質の測定が可能となったことは、食品メタボロミクス研究にとって画期的な成果と言える。また、従来からの醸造過程代謝物の測定法であるオクタデシルシリカカラム法に比べ、本法は約2倍の種類の代謝物を測定でき、網羅分析法として極めて優れた方法である。

味噌のメタボロミクス研究の成果としては、発酵期間の違いによってアミノ酸、有機酸ならびにアマドリ化合物の濃度が変化すること、すなわちこれらの物質が味噌の熟成度を反映する物質であることが明らかになった。初期的な研究ではあるが、これらの結果は第3章の成果と併せて、日本独自の食品に対するメタボロミクス研究の確固たる成果と言える。

第5章は、第1章から第4章の総括である。特に、第3章・第4章で用いた液体クロマトグラフィー質量分析の方法が現在では市販品として提供されていて、世界的にも普及しつつあること、食品メタボロミクス研究の進展に貢献しつつあることが述べられている。さらに本法の利用の拡大に伴って、補酵素、糖リン酸、トリペプチドの分析にも応用できることが明らかになったとしている。本研究で開発した方法が、汎用性と発展性の高いものであることが分かる。

以上のように、本論文は日本独自の食品に対してメタボロミクス研究を応用することを目的に、液体クロマトグラフィー質量分析法による醸造過程代謝物の網羅分析法を確立し、食品分析に適用した先駆的研究である。カラムスイッチングとトラップカラムを併用したイオン交換クロマトグラフィーの質量分析検出システムへの応用、137種の醸造過程代謝物に加えアマドリ化合物の網羅分析も可能とした液体クロマトグラフィー質量分析法の開発ならびに同法を基礎とした醤油と味噌のメタボロミクス研究の成果は、分析化学的にも食品化学的にも優れたものと言える。したがって、本論文は自然と人間の調和的な共生を可能にする新しい科学・技術のあり方を探究する相関環境学専攻にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あると認める。また、平成27年4月6日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降